

JP11286616

EPODOC / EPO

PN - JP11286616 A 19991019
 PD - 1999-10-19
 PR - JP19980091211 19980403
 OPD - 1998-04-03
 TI - NUCLEIC ACID STAINING AGENT, METHOD FOR DETECTING DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACID, AND REAGENT FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID
 AB - PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a nucleic acid staining agent which undergoes a marked change in fluorescent characteristics, especially, in fluorescent intensity dependent of the presence or absence of a double-stranded nucleic acid by selecting a 3,8-diazo-6-phenylphenanthridine derivative. SOLUTION: A derivative (ethidium bromide derivative) of the formula is used. In the formula, R1 is an alkyl; R2 is a halide ion; R3 and R4 are each phenyl, anilino, hydroxyphenyl, an alkylanilino, a dialkylanilino, a dihydroxyalkylanilino, a 2-(N-alkylanilino)ethanol, naphthyl, or naphthol. The ethidium bromide derivative may be used as such or in the form dissolved or dispersed in a suitable solvent or dispersion medium. The solvent and the dispersion medium are exemplified by water, acetonitrile, dimethyl sulfoxide, and various buffer solutions such as a phosphate buffer solution, and an acetate buffer solution. The solution or the dispersion has an ethidium bromide derivative concentration of, desirably, 1×10^{-8} to 1×10^{-5} M.
 IN - FUKUSHIMA YASUMASA
 PA - UNITIKA LTD
 IC - C09B56/00; C09B33/12; C09K11/06; C12Q1/68; G01N21/78; G01N33/533; G01N33/566
DERIVENT
 TI - Nucleic acid-staining agents - useful e.g. for detecting and identifying base sequences of viruses, microorganisms, animals, plants and humans
 PR - JP19980091211 19980403
 PN - JP11286616 A 19991019 DW200001 C09B56/00 006pp
 PA - (NIRA) UNITIKA LTD
 IC - C09B33/12; C09B56/00; C09K11/06; C12Q1/68; G01N21/78; G01N33/533; G01N33/566
 AB - JP11286616 Nucleic acid-staining agent comprises a 3,8-diazo-6-phenylphenanthridine derivative of formula (I). R1= alkyl; R2 = halo; R3, R4 = phenyl, anilino, hydroxyphenyl, alkylanilino, dialkylanilino, dihydroxyalkylanilino, 2-(N-alkylanilino)ethanol or naphthol. Also claimed are: (1) a detection method for double strand nucleic acids comprising measuring changes in fluorescent properties such as fluorescent strength and fluorescent wavelength which occur due to interaction between (I) and double strand nucleic acids; and (2) detection reagents for target nucleic acids containing a probe comprising a single strand nucleic acid bearing a nucleic acid sequence complementary to the target nucleic acid and (I).
 - USE - The nucleic acid-staining agents are useful for detecting and identifying base sequences of viruses, microorganisms, animals, plants and humans (using optical means) and detecting variations in the various base sequences. The method and reagents for detection are useful for gene diagnosis, cloning of useful genes and exploration of unknown genes.
 - (Dwg.0/2)
 OPD - 1998-04-03
 AN - 2000-007079 [01]
PAJ / JPJ
 PN - JP11286616 A 19991019
 PD - 1999-10-19
 AP - JP19980091211 19980403
 IN - FUKUSHIMA YASUMASA

- PA - UNITIKA LTD
- TI - NUCLEIC ACID STAINING AGENT, METHOD FOR DETECTING DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACID, AND REAGENT FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID
- AB - PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a nucleic acid staining agent which undergoes a marked change in fluorescent characteristics, especially, in fluorescent intensity dependent of the presence or absence of a double-stranded nucleic acid by selecting a 3,8-diazo-6-phenylphenanthridine derivative.
- SOLUTION: A derivative (ethidium bromide derivative) of the formula is used. In the formula, R1 is an alkyl; R2 is a halide ion; R3 and R4 are each phenyl, anilino, hydroxyphenyl, an alkylanilino, a dialkylanilino, a dihydroxyalkylanilino, a 2-(N-alkylanilino)ethanol, naphthyl, or naphthol. The ethidium bromide derivative may be used as such or in the form dissolved or dispersed in a suitable solvent or dispersion medium. The solvent and the dispersion medium are exemplified by water, acetonitrile, dimethyl sulfoxide, and various buffer solutions such as a phosphate buffer solution, and an acetate buffer solution. The solution or the dispersion has an ethidium bromide derivative concentration of, desirably, 1×10^{-8} to 1×10^{-5} M.
- C09B56/00 ;C09B33/12 ;C09K11/06 ;C12Q1/68 ;G01N21/78 ;G01N33/533 ;G01N33/566

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-286616

(43)公開日 平成11年(1999)10月19日

| (51)Int.Cl. | 識別記号 | FI | |
|---------------|------|---------------|---|
| C 0 9 B 56/00 | | C 0 9 B 56/00 | |
| 33/12 | | 33/12 | |
| C 0 9 K 11/06 | | C 0 9 K 11/06 | |
| C 1 2 Q 1/68 | | C 1 2 Q 1/68 | A |
| G 0 1 N 21/78 | | G 0 1 N 21/78 | C |

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-91211

(22) 出願日 平成10年(1998) 4月3日

(71) 出願人 000004503

ユニチ力株式会社

兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

(72)発明者 福島 康正

京都府宇治市宇治小桜23番地 工二千力株
式会社中央研究所内

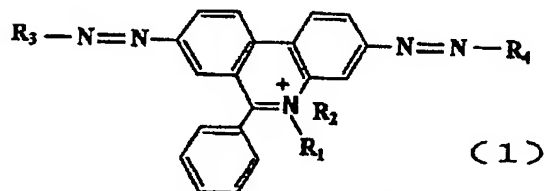
(54)【発明の名称】 核酸染色剤、それを用いた二本鎖核酸の検出方法及び環状核酸の検出試薬

(57) 【要約】

【課題】 二本鎖核酸と相互作用することによって蛍光特性が変化する核酸染色剤及びそれを用いた二本鎖核酸の検出方法及び検出試薬を提供する。

【解決手段】 下記一般式(1)で示される3, 8-ジ
アゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体含有して
なることを特徴とする核酸染色剤。

【化1】

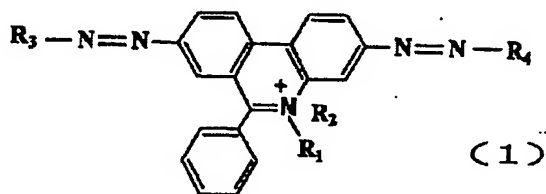


(なお、式中のR₁ はアルキル基を表し、R₂ はハロゲンイオンを表し、R₃ 及びR₄ はフェニル基、アニリノ基、ヒドロキシフェニル基、アルキルアニリノ基、ジアルキルアニリノ基、ジヒドロキシアルキルアニリノ基、2-(N-アルキルアニリノ)エタノール基、ナフチル基、ナフトール基を表す。)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で示される3, 8-ジアゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体を含有してなることを特徴とする核酸染色剤。

【化1】



(なお、式中のR₁ はアルキル基を表し、R₂ はハロゲンイオンを表し、R₃ 及びR₄ はフェニル基、アニリノ基、ヒドロキシフェニル基、アルキルアニリノ基、ジアルキルアニリノ基、ジヒドロキシアルキルアニリノ基、2-(N-アルキルアニリノ)エタノール基、ナフチル基、ナフトール基を表す。)

【請求項2】 前記一般式(1)で示される3, 8-ジアゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体が二本鎖核酸と相互作用することによって生じる蛍光特性の変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸の検出方法。

【請求項3】 標的核酸に相補的な核酸配列を有する一本鎖ヌクレオチドからなるプローブと、前記一般式(1)で示される3, 8-ジアゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体を含有してなることを特徴とする標的核酸の検出試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はウイルス、微生物、動植物、ヒト等の核酸の特定の塩基配列を光学的手段を用いて検出、同定、もしくは各種塩基配列における変異の有無の検出に有用な核酸染色剤及びそれを用いた遺伝子診断、有用遺伝子のクローニング、未知遺伝子の探索等における二本鎖核酸の検出方法及び検出試薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】核酸の分析技術の発達により種々の変異遺伝子が多く見いだされ、遺伝子の変異はタンパク質の変異を引き起こし、それによってさまざまな疾病が引き起こされていることが明らかになってきた。現在、これらの疾病は酵素によるアッセイや抗体による免疫的な方法によって診断、発見されることが主流であるが、早期発見及び早期治療という観点から、遺伝子上での変異を早期に発見することのできる遺伝子診断の重要性が指摘されている。また、遺伝子診断は、感染した細菌の同定にも多く利用されている。

【0003】細菌感染症における原因細菌の遺伝子の検出又は同定の分野においては、DNA-DNAハイブリダイゼーション法又はDNA-RNAハイブリダイゼーション法を用いる試みがなされている。この方法は、細

菌の核酸の特定部分に着目して、その部分の塩基配列が対象とする被検核酸サンプル中に存在するか否かをハイブリダイゼーション法によって測定することによってサンプル中に問題となる細菌が存在するか否かを判定する方法である。

【0004】ハイブリダイゼーション法の典型的な手順としては、被検核酸を変性して不溶性担体に結合し、これを酵素やラジオアイソトープで標識された標的核酸と相補的な塩基配列を有するプローブとインキュベートしてハイブリッド体を形成させ、その後、不溶性担体を洗浄して標的配列と結合していないプローブを洗い流し、酵素反応やラジオアイソトープ等により標的核酸量を定量する操作である。

【0005】しかし、上記のような不溶性担体を用いたハイブリダイゼーション法では、未反応プローブの除去(B/F分離)が必要であり、その操作は極めて煩雑である。さらに、プローブがこの不溶性担体に吸着してしまうため、不溶性担体上のハイブリッド体の標識物質を測定する段階でこの不溶性担体に吸着したプローブ由来する信号が測定結果に紛れ込み、試料中の標的核酸の有無及びその量の測定結果に誤差が生じ、正しい判定が困難であるという問題がある。

【0006】そこで、これらの問題を回避する方法として、溶液中でのハイブリダイゼーション法、いわゆる、均一系での方法の開発が望まれている。この均一系での最大の課題は、標的核酸に結合しているプローブと結合していないプローブを識別する必要があることである。

【0007】B/F分離を行わずにハイブリッド体を検出する方法としては、蛍光偏光解消法を利用した方法が提案されている(特開平2-75958号公報、特開平2-295496号公報)。この方法は、蛍光色素標識されたプローブを用い、一本鎖核酸の蛍光偏光とハイブリッド体の蛍光偏光の違いにより標的核酸の有無を判定する方法であり、その原理は、プローブに結合した蛍光色素が二本鎖になったことにより運動しにくくなり、蛍光異方性が増大することを利用している。しかし、この方法では検体中にタンパク質等の夾雑物が含まれていると、プローブがそれらに非特異的に吸着し、ハイブリッド体検出のバックグラウンドを上昇させる原因となるため、あらかじめこれらの夾雑物を完全に除去するという煩雑な操作が必要となる。

【0008】また、光励起エネルギーの移動を利用したハイブリッド体の検出法が提案されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8790-8794)。この方法は、エネルギー供与体化合物とエネルギー受容体化合物とから構成されており、プローブが標的核酸にハイブリッドした時、両化合物が近接に存在するためエネルギー供与体から励起エネルギーが受容体に移動することで、エネルギー供与体の励起寿命及び蛍光強度の減少又は受容体の蛍光強度の増加が観測される。これらの現象を利用す

ることによりハイブリダイゼーションの有無を溶液のまま測定でき、一連の煩雑な操作を省くことができる画期的な方法であるが、感度が既存の方法に比べて数オーダー低く、実用化には到っていないのが現状である。

【0009】さらに、インターカレーター性蛍光色素を用いたハイブリッド体の検出方法が提案されている（特開平8-211050号公報）。この方法は、色素がハイブリッド体にインターカレーションしたときの蛍光特性の変化を測定することによりハイブリッド体を検出する方法である。また、特開平9-406611号公報には、ビリリウム塩又はその類似塩をインターカレーター性色素として利用することができることが開示されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これらの色素は、二本鎖核酸の有無に対する蛍光強度の変化が小さいという問題点があった。本発明は、二本鎖核酸の有無に対する蛍光特性の変化、特に蛍光強度の変化が大きい核酸染色剤及びそれを用いた二本鎖核酸の検出方法及び検出試薬を提供することを目的とするものである。

【0011】

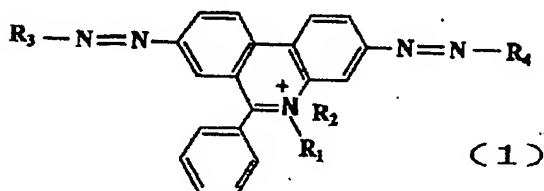
【課題を解決するための手段】本発明者は、このような核酸染色剤を提供するために鋭意検討の結果、3, 8-ジアゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体は核酸と相互作用することによりその蛍光強度及び蛍光波長が変化するということを見出し、本発明に到達した。

【0012】すなわち、第1の発明は、下記一般式

(1) で示される3, 8-ジアゾ-6-フェニルフェナンスリジン誘導体（以下、エチジウムブロミド誘導体と記載する）を含有してなることを特徴とする核酸染色剤を要旨とするものである。

【0013】

【化2】



【0014】（なお、式中のR₁ はアルキル基を表し、R₂ はハロゲンイオンを表し、R₃ 及びR₄ はフェニル基、アニリノ基、ヒドロキシフェニル基、アルキルアニリノ基、ジアルキルアニリノ基、ジヒドロキシアルキルアニリノ基、2-(N-アルキルアニリノ)エタノール基、ナフチル基、ナフトール基を表す。）

【0015】また、第2の発明は、前記一般式(1)で示されるエチジウムブロミド誘導体が二本鎖核酸と相互作用することによって生じる蛍光特性の変化を測定することを特徴とする二本鎖核酸の検出方法を要旨とするものである。さらに第3の発明は、標的核酸に相補的な核

酸配列を有する一本鎖ヌクレオチドからなるプローブと、前記一般式(1)で示されるエチジウムブロミド誘導体を含有してなることを特徴とする標的核酸の検出試薬を要旨とするものである。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるエチジウムブロミド誘導体は上記一般式(1)で示されるものである。上記一般式中のR₁としてはメチル基、エチル基、プロピル基等のアルキル基が挙げられ、R₂としては、臭素、塩素等のハロゲンイオンが挙げられ、R₃ 及びR₄ としては、電子供与基であるフェニル基、アニリノ基、ヒドロキシフェニル基、メチルアニリノ基、エチルアニリノ基等のアルキルアニリノ基、ジメチルアニリノ基、ジエチルアニリノ基等のジアルキルアニリノ基、ジメタノールアニリノ基、ジエタノールアニリノ基等のジヒドロキシアルキルアニリノ基、2-(N-エチルアニリノ)エタノール基等の2-(N-アルキルアニリノ)エタノール基、ナフチル基、ナフトール基が挙げられる。

【0017】本発明の核酸染色剤は、上記のエチジウムブロミド誘導体をそのまま用いてもよく、また、適当な溶媒や分散剤に溶解又は分散させてもよい。このような溶媒及び分散剤としては、水、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液等の各種緩衝液等が挙げられる。このときのエチジウムブロミド誘導体の濃度としては、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ Mが好ましい。

【0018】また、本発明の核酸染色剤は、上記のエチジウムブロミド誘導体が標的核酸を検出するためのプローブに結合した形であってもよい。プローブとしては、標的核酸中の特定の塩基配列に対して完全に相補的な核酸配列を有することが好ましいが、一部の塩基が相補的配列でなくても標的核酸との結合に支障がなければ問題は無い。特定の塩基配列は、標的核酸中の10~30塩基からなる核酸配列であり、この配列が他の核酸と識別可能な配列であることが好ましい。

【0019】エチジウムブロミド誘導体とプローブとの結合は、プローブにエチジウムブロミド誘導体を直接結合させてもよく、適当な分子長のリンカーを介して結合させてもよい。リンカーとしては、ハイブリッド体形成及びエチジウムブロミド誘導体と二本鎖核酸との相互作用を妨げない分子であれば特に限定されるものではないが、結合操作の容易性等の観点から、両末端に官能基を有する二官能性炭化水素を用いることが好適である。

【0020】エチジウムブロミド誘導体とプローブとの結合部位としては、同じくハイブリッド体形成及びエチジウムブロミド誘導体と二本鎖核酸との相互作用を妨げない部位であれば特に限定されるものではなく、プローブの5'末端、3'末端又は中央部分のいずれであってもよい。ただし、プローブを共存させた状態でPCR法

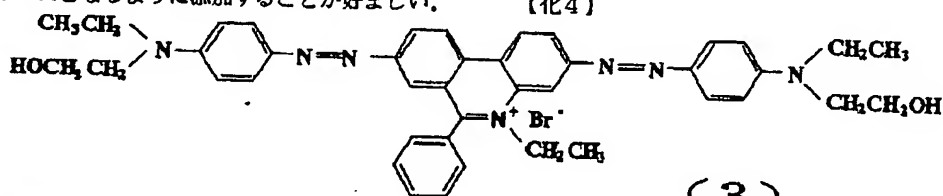
等の遺伝子増幅を実施する場合には、DNA合成酵素による核酸の伸長反応を阻害しないようにエチジウムブロミド誘導体をプローブの5'末端に結合させることが好ましい。

【0021】次に、本発明の二本鎖核酸の検出方法について説明する。本発明の二本鎖核酸の検出方法は、上記のエチジウムブロミド誘導体を核酸染色剤として用い、エチジウムブロミド誘導体が二本鎖核酸と相互作用することにより生じる蛍光特性の変化を測定することによって行う。なお、エチジウムブロミド誘導体と二本鎖核酸との相互作用とは、エチジウムブロミド誘導体が二本鎖核酸にインターカレートしている状態であると思われるが、特に本発明でいう相互作用は、インターカレーションに限定されるものではない。

【0022】本発明においては、二本鎖核酸と相互作用する前のエチジウムブロミド誘導体は親水性の高い水分子に囲まれた状況にあるが、二本鎖核酸と相互作用すると、その化合物は疎水性の高い核酸塩基に囲まれた状況となるため、蛍光特性が変化する。このため、この蛍光特性の変化を例えば、特定波長における蛍光強度の変化や極大最大波長の変化等によって測定することにより、二本鎖核酸を検出、定量することができるのである。

【0023】本発明の検出方法は、プローブを用いたハイブリダイゼーション法において、プローブと標的核酸のハイブリッド体を検出するのに利用することができる。この場合、予めエチジウムブロミド誘導体をプローブに結合させておいてこれを標的核酸とハイブリダイズさせて検出することもできるし、エチジウムブロミド誘導体の結合していないプローブをまず標的核酸とハイブリダイズさせ、これにエチジウムブロミド誘導体を添加して検出することもできる。また、本発明の検出方法は、プローブあるいは試料を固定した状態及び溶液中でのハイブリダイゼーションに適応することができる。

【0024】二本鎖核酸に添加するエチジウムブロミド誘導体の量としては、二本鎖核酸に対してエチジウムブロミド誘導体が過剰となることが好ましく、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ となるように添加することが好ましい。



【0030】得られたEB2NEEを核酸染色剤として用い、溶液中の二本鎖核酸の測定を行った。なお、二本鎖核酸としては、市販のもの(Calf thymus DNA、ベリンガー社製)を用いた。まず、ジメチルスルホキシドに100mMの濃度となるようにEB2NEEを溶解した後、50mMのNaClを含む5mMのTrisHCl緩衝液(pH7.5)で100倍に希釈し、励起波長350nm

【0025】蛍光特性の変化の測定方法としては、二本鎖核酸と共存させない状態で測定したエチジウムブロミド誘導体の蛍光スペクトルと二本鎖核酸と共存させた状態で測定した蛍光性物質の蛍光スペクトルから蛍光極大波長を比較することにより、又は両スペクトルの蛍光極大波長における両スペクトルの蛍光強度を比較することによって蛍光特性の変化を測定すればよい。

【0026】また、本発明の標的核酸の検出試薬は、プローブとエチジウムブロミド誘導体を含有してなるものであり、エチジウムブロミド誘導体はプローブに結合した形でもよく、結合していない形でもよい。

【0027】

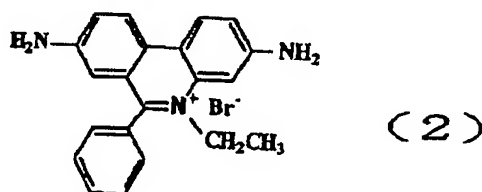
【実施例】以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。

実施例1

下記構造式(2)で示されるエチジウムブロミド1g(2.5mmol)を50mlのアセトンに溶解し、そこへ2.8mlの6Mの塩酸(15mmol)、10mlの水及び340mg(5.0mmol)の亜硝酸ナトリウムを加え、0℃で2時間攪拌した。その後、826mg(5.0mmol)の2-(N-エチルアニリノ)エタノールを添加し、0℃で20時間攪拌した。炭酸水素ナトリウムを添加して溶液を中性にした後、沈殿物をろ取し、水で洗浄した。沈殿物を塩化メチレンに溶解し、シリカゲルカラムで精製することにより下記構造式(3)で示されるエチジウムブロミド誘導体(以下、EB2NEEと記載する)を得た(収量0.78g)。

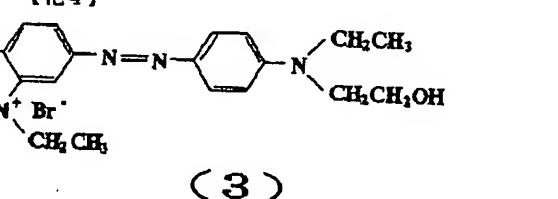
【0028】

【化3】



【0029】

【化4】



mにおける蛍光スペクトルを蛍光分光計FP-777(日本分光社製)を用いて測定した(図1の点線)。次に、二本鎖核酸の塩基対濃度がEB2NEE濃度の25倍となるように二本鎖核酸を添加し、その蛍光スペクトルを同様の励起波長で測定した(図1の実線)。図1は、二本鎖核酸の存在下及び非存在下でのEB2NEEの蛍光スペクトルを示す図であり、縦軸に蛍光強度を、

横軸に蛍光波長を示している。図1からわかるように二本鎖核酸の非存在下でのEB2NEEの蛍光極大波長は425nmであるが、二本鎖核酸が存在する時の蛍光極大波長は398nmであり、EB2NEEが二本鎖核酸と相互作用することにより、蛍光波長が27nm移動した。また、二本鎖核酸が存在する時の398nmの蛍光強度は、存在しない時のその約50倍であった。このことから、蛍光波長398nmの蛍光強度を測定することによって二本鎖核酸を検出することが可能であることがわかる。

【0031】実施例2

1本鎖M13mp18DNA（宝酒造社製）と部分的に相補的な塩基配列を有する配列番号1に示す20量体オリゴヌクレオチドをアプライドバイオシステムズ社製391DNA自動合成機を用いて合成した。CPG担体からの切り出し、脱保護、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による精製はアプライドバイオシステムズ社指定の方法により行った。このオリゴヌクレオチドの5'末端に、グレンリサーチ社製の試薬5'チオールモディファイアーC6を用いてチオールリンカーを結合させた。

【0032】得られたオリゴヌクレオチド（260nmにおける吸光度が5）を100mMのTrisHCl緩衝液（pH7.5）50mlに溶解し、これに1Mの硝酸銀溶液を7.5ml加え、攪拌後、室温で40分放置した。1Mのジチオスレイトール（DTT）溶液を10ml加えて攪拌後、室温で30分放置した。遠心分離により沈殿物を除き、高速液体クロマトグラフィーでプロ-

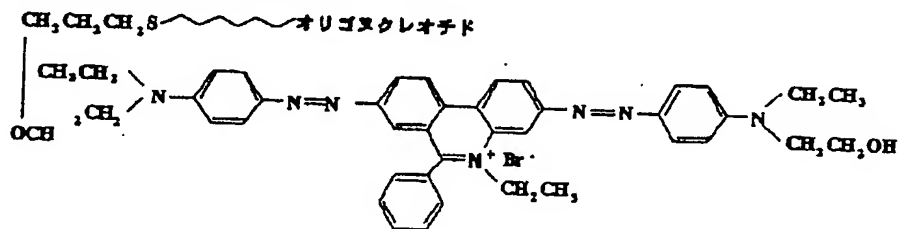
ブを精製した。これに0.01MのDTTを20ml加え、攪拌後、アルゴン置換を行った。（溶液1）

【0033】1g（1.3mmol）のEB2NEEと0.08g（1.4mmol）の水酸化カリウムを10mlのグリコールモノメチルエーテルに溶解し、そこに0.23g（1.4mmol）の1,3-ジヨードプロパンを加え、5時間加熱還流した。これに10mlの水を加え、よく振り混ぜた後、水層を除去した。これにヘキサンを加えて析出した固体を濾過して集めた（収量0.58g）。この析出した固体の15mgをジメチルホルムアミド200ml、1Mのリン酸緩衝液（pH10.0）300ml及び水500mlを加え、その後アルゴン置換した。（溶液2）

【0034】この溶液2に溶液1を容量が2:1になるように混合し、室温で2時間放置した後、セファデックスG-25（ファルマシア社製）を用いたゲル濾過に供し、取得物を乾燥後、高速液体クロマトグラフィーで精製することにより下記構造式（4）で示されるEB2NEEの結合したプローブを得た。なお、高速液体クロマトグラフィー操作において使用した緩衝液は、0.1MのTrisHCl（pH7.5）/50重量%アセトニトリルであり、セファデックスG-25のゲル濾過操作に用いた緩衝液は、0.1MのTrisHCl（pH7.5）/5重量%アセトニトリルである。

【0035】

【化5】



(4)

【0036】実施例3

実施例2で作製したEB2NEE結合プローブを用いてM13mp18DNAの検出を行った。M13mp18DNA（宝酒造社製）200pmolとEB2NEE結合プローブ200pmolを50mMのNaClを含む5mMのTrisHCl緩衝液（pH7.5）1mlに溶解し、90℃まで加熱後、放冷して徐々に室温（約20℃）までもどしてM13mp18DNAにプローブをハイブリダイズさせた。このハイブリッド体の励起波長350nmにおける蛍光スペクトルを測定した。また、M13mp18DNAを添加しない以外は同様にして蛍光スペクトルを測定した。この結果、プローブだけの溶液では蛍光極大波長が425nmであったのに対し、ハイブリッド体の場合は、蛍光極大波長は399nmであり、また、ハイブリ-

ッド体の場合の蛍光強度はプローブだけの場合の蛍光強度の約5倍であった。これらの結果から、試料中にEB2NEE結合プローブを添加することにより特定核酸の検出を行うことが可能であることがわかる。

【0037】実施例4

実施例2で作製したEB2NEE結合プローブ200pmolに、M13mp18DNA（宝酒造社製）の0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、7.5、10.0、15.0又は20.0当量添加し、実施例1と同様にして励起波長350nm、蛍光波長398nmの蛍光強度を測定した。その結果を図2に示す。図2は、EB2NEE結合プローブを用いてM13mp18DNAを定量したときの結果を示す図であり、縦軸に蛍光強度を、横軸にプローブ量を示している。図2

より、試料中の標的核酸の量に比例して蛍光強度が増加していることがわかる。従って、試料にEB2NEE結合プローブを添加し、その蛍光強度を測定することにより試料中の特定核酸の定量を行うことができることがわかる。

【0038】

【発明の効果】本発明の核酸染色剤は、二本鎖核酸と相互作用することにより、蛍光強度及び蛍光波長が変化することができる。均一系での標的核酸の検出及び定量に利用することができる。また、本発明の二本鎖核酸の検出方法及び検出試薬によれば、標識プローブの除去操作を行うことなしに、標的核酸の存在の有無及び量を決定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】二本鎖核酸の存在下及び非存在下でのEB2NEEの蛍光スペクトルを示す図である。

【図2】EB2NEEで標識されたプローブを用いて標的核酸を定量したときの結果を示す図である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

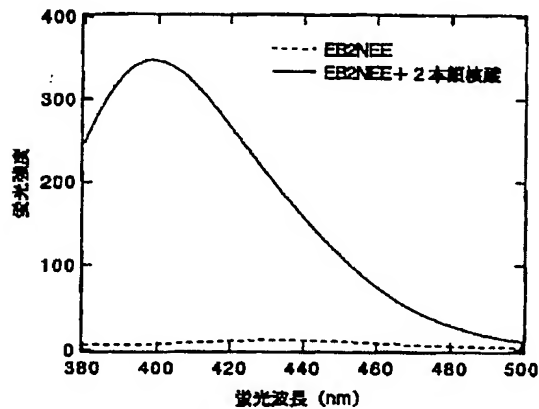
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

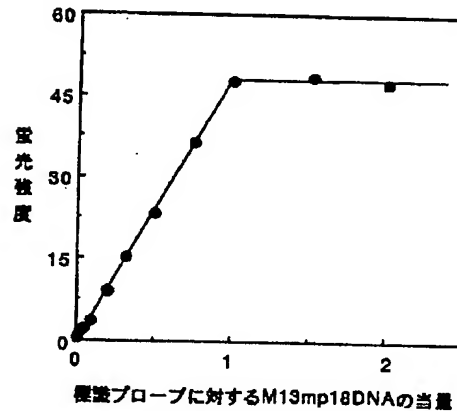
配列

GTTTTCCCAG TCACGACGTT
20

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

G01N 33/533
33/566

識別記号

FI

G01N 33/533
33/566